

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 13 June 2000 (13.06.00)	
International application No. PCT/CU99/00006	Applicant's or agent's file reference
International filing date (day/month/year) 01 December 1999 (01.12.99)	Priority date (day/month/year) 02 December 1998 (02.12.98)
Applicant AGUILAR RUBIDO, Julio César et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

20 May 2000 (20.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer S. Mafla Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

REC'D 13 FEB 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 074	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/CU99/00006	International filing date (day/month/year) 01/12/1999	Priority date (day/month/year) 02/12/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/29		
Applicant CENTRO DE INGENIERIA GENETICA ...et al		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.



2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20/05/2000	Date of completion of this report 08.02.2001
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Moreno de Vega, C Telephone No. +49 89 2399 7486 

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/CU99/00006

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).)*:

Description, pages:

1-12' as originally filed

Claims, No.:

2-10' as originally filed

1 with telefax of 08/12/2000

Drawings, sheets:

1/5-5/5' as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/CU99/00006

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	3-10
	No:	Claims	1, 2
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	4,5
	No:	Claims	1-3, 6-10
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-10
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:
see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/CU99/00006

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 94 12617 A (INT BIOTECHNOLOGY LAB INC) 9 June 1994 (1994-06-09)
- D2: EP-A-0 271 302 (SCRIPPS CLINIC RES) 15 Juni 1988 (1988-06-15)
- D3: EP-A-0 835 663 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG) 15 April 1998 (1998-04-15)
- D4: US-A-5 840 303 (FERRARI CARLO ET AL) 24 November 1998 (1998-11-24)
- D5: EP-A-0 534 615 (CYTEL CORP) 31 March 1993 (1993-03-31)

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The applicant's observations submitted have been considered, some expressed opinions are nevertheless maintained for the following reasons:

1. Novelty (Article 33(2) PCT)

D1 (see page 20 line 10 - page 23 line 15, page 40 lines 6-34, claim 40) discloses vaccine formulations comprising a mixture of two or more recombinant viruses, said viruses containing plural HBV antigens including surface and core antigens. These formulations are administered by different routes, including intranasal.

D2 (see page 3 lines 10-30, page 7 line 47 - page 8 line 50) discloses an immunogenic polypeptide conjugate that comprises a HBcAg protein operatively linked through an amino acid chain to a pathogen related immunogen such as HBsAg, and vaccines containing said conjugate, to be administered via parenteral, rectal or oral routes.

D3 (see page 1 lines 47-54, page 3, line 12 - page 4 line 50) describes a combined vaccine composition directed to the prevention of more than two

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/CU99/00006

diseases, comprising HBsAg and an antigen selected from an antigen providing immunity against one or more of the following: diphtheria, tetanus, pertussis, inactivated polio, Haemophilus influenzae b and Hepatitis A. The vaccine is not intended to be administered via the nasal route.

D4 (see column 2 line 49 - column 3 line 67, column 16 line 66 - column 17 line 14) discloses peptides which induce MHC class I restricted cytotoxic T lymphocyte responses against HBV antigen, said peptides are derived from the HBV nucleocapsid and combined with other peptides or proteins that induce immune response to other HBV antigens, such as HBsAg. This document appears to be novelty destroying for claims 1 and 2.

D5 (see page 3 line 5 - page 5 line 32, page 13 lines 13-20, claims 7-9, 17) discloses CTL/T helper peptide conjugate comprising a CTL inducing peptide linked to a T helper peptide, where the CTL inducing peptide is HBsAg or a HBcAg and the T helper peptide is hepatitis B core peptide or tetanus toxoid, and pharmaceutical compositions comprising said peptides. This document appears to be novelty destroying for claims 1 and 2.

Thus, claims 1 and 2 do not meet the requirements of Article 33(2) PCT.

Claims 3-10 are considered to be novel, as they are not disclosed in the known prior art.

2. Inventive step (Article 33(3) PCT)

Claims 3 and 6-10 are not considered to be inventive. D4 and D5, considered to be the most relevant prior art, fail to disclose the vaccine formulation containing a hepatitis B Virus surface antigen plus the nucleocapsid antigen of Hepatitis B Virus (claim 3) or any other vaccine antigen (claim 6). The technical problem to be solved by these claims is the provision of formulations to enhance the immune response to antigens administered through mucosal routes. The solution provided by claims 3, 6-10 would be obvious for the person skilled in the art in the light of the disclosure

of D4 and D5 and of D2, which described the combination of HBcAg and HBsAg in an immunogenic polypeptide conjugate.

Claims 4 and 5 are considered to be inventive. D5, which is considered to be the most relevant prior art, fails to disclose a combined vaccine with a virus-like particle containing the nucleocapsid antigen of human papilloma virus (HPV) or hepatitis C virus (HCV). The technical problem to be solved by claims 4 and 5 is the provision of formulations to enhance the immune response to antigens administered through mucosal routes. The solution proposed by these claims is based on the synergistic effect in increasing immunogenicity produced by the combination of HBsAg plus another antigen (see Examples 4 and 5, Figures 4 and 5). The success of the combination of the surface antigen of a virus with antigens of HPV or HCV for the preparation of a vaccine composition with improved immunogenicity would not have been obvious for the person skilled in the art, because the nature of the interaction of these different antigens at the nasal level could not be predicted from the teaching of the prior art.

3. For the assessment of the present claims 9 and 10 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VII

Certain defects in the international application

Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in the documents D2, D4 and D5 is not mentioned in the

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/CU99/00006

description, nor are these documents identified therein.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

The wording of claim 1 is unclear (Article 6 PCT). It seems that before "preservatives and stabilizers can be added" it should read "wherein"; moreover, the concentration of antigens is not expressed in concentration units, but in absolute mass units.

New Claim 1.

1. A vaccine formulation for nasal administration wherein the components are (a) surface antigen from virus and (b) one or more non-living vaccine antigens synergizing in adjuvant effect with (a), the antigen concentrations are in the range up to 1 mg each, preservatives and stabilizers can be added.

AMENDED SHEET

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

VAZQUEZ CASTILLO, Mariela
Ave. 31 entre 158 y 190
Cubanacan, Playa
CU - C. habana 10600
CUBA

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year) 08.02.2001

Applicant's or agent's file reference
074

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/CU99/00006

International filing date (day/month/year)
01/12/1999

Priority date (day/month/year)
02/12/1998

Applicant

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA ...et al

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer

Danti, B

Tel. +49 89 2399 3161





PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 074	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CU99/00006	International filing date (day/month/year) 01/12/1999	Priority date (day/month/year) 02/12/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/29		
Applicant CENTRO DE INGENIERIA GENETICA ...et al		
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 1 sheets.</p>		
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application 		
Date of submission of the demand 20/05/2000	Date of completion of this report 08.02.2001	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Moreno de Vega, C Telephone No. +49 89 2399 7486 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/CU99/00006

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*
Description, pages:

1-12' as originally filed

Claims, No.:

2-10' as originally filed

1 with telefax of 08/12/2000

Drawings, sheets:

1/5-5/5' as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/CU99/00006

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims 3-10
	No: Claims 1, 2
Inventive step (IS)	Yes: Claims 4,5
	No: Claims 1-3, 6-10
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims 1-10
	No: Claims

2. Citations and explanations
see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:
see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/CU99/00006

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 94 12617 A (INT BIOTECHNOLOGY LAB INC) 9 June 1994 (1994-06-09)
- D2: EP-A-0 271 302 (SCRIPPS CLINIC RES) 15 Juni 1988 (1988-06-15)
- D3: EP-A-0 835 663 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG) 15 April 1998 (1998-04-15)
- D4: US-A-5 840 303 (FERRARI CARLO ET AL) 24 November 1998 (1998-11-24)
- D5: EP-A-0 534 615 (CYTEL CORP) 31 March 1993 (1993-03-31)

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The applicant's observations submitted have been considered, some expressed opinions are nevertheless maintained for the following reasons:

1. Novelty (Article 33(2) PCT)

D1 (see page 20 line 10 - page 23 line 15, page 40 lines 6-34, claim 40) discloses vaccine formulations comprising a mixture of two or more recombinant viruses, said viruses containing plural HBV antigens including surface and core antigens. These formulations are administered by different routes, including intranasal.

D2 (see page 3 lines 10-30, page 7 line 47 - page 8 line 50) discloses an immunogenic polypeptide conjugate that comprises a HBcAg protein operatively linked through an amino acid chain to a pathogen related immunogen such as HBsAg, and vaccines containing said conjugate, to be administered via parenteral, rectal or oral routes.

D3 (see page 1 lines 47-54, page 3, line 12 - page 4 line 50) describes a combined vaccine composition directed to the prevention of more than two

diseases, comprising HBsAg and an antigen selected from an antigen providing immunity against one or more of the following: diphtheria, tetanus, pertussis, inactivated polio, Haemophilus influenzae b and Hepatitis A. The vaccine is not intended to be administered via the nasal route.

D4 (see column 2 line 49 - column 3 line 67, column 16 line 66 - column 17 line 14) discloses peptides which induce MHC class I restricted cytotoxic T lymphocyte responses against HBV antigen, said peptides are derived from the HBV nucleocapsid and combined with other peptides or proteins that induce immune response to other HBV antigens, such as HBsAg. This document appears to be novelty destroying for claims 1 and 2.

D5 (see page 3 line 5 - page 5 line 32, page 13 lines 13-20, claims 7-9, 17) discloses CTL/T helper peptide conjugate comprising a CTL inducing peptide linked to a T helper peptide, where the CTL inducing peptide is HBsAg or a HBcAg and the T helper peptide is hepatitis B core peptide or tetanus toxoid, and pharmaceutical compositions comprising said peptides. This document appears to be novelty destroying for claims 1 and 2.

Thus, claims 1 and 2 do not meet the requirements of Article 33(2) PCT.

Claims 3-10 are considered to be novel, as they are not disclosed in the known prior art.

2. Inventive step (Article 33(3) PCT)

Claims 3 and 6-10 are not considered to be inventive. D4 and D5, considered to be the most relevant prior art, fail to disclose the vaccine formulation containing a hepatitis B Virus surface antigen plus the nucleocapsid antigen of Hepatitis B Virus (claim 3) or any other vaccine antigen (claim 6). The technical problem to be solved by these claims is the provision of formulations to enhance the immune response to antigens administered through mucosal routes. The solution provided by claims 3, 6-10 would be obvious for the person skilled in the art in the light of the disclosure

of D4 and D5 and of D2, which described the combination of HBcAg and HBsAg in an immunogenic polypeptide conjugate.

Claims 4 and 5 are considered to be inventive. D5, which is considered to be the most relevant prior art, fails to disclose a combined vaccine with a virus-like particle containing the nucleocapsid antigen of human papilloma virus (HPV) or hepatitis C virus (HCV). The technical problem to be solved by claims 4 and 5 is the provision of formulations to enhance the immune response to antigens administered through mucosal routes. The solution proposed by these claims is based on the synergistic effect in increasing immunogenicity produced by the combination of HBsAg plus another antigen (see Examples 4 and 5, Figures 4 and 5). The success of the combination of the surface antigen of a virus with antigens of HPV or HCV for the preparation of a vaccine composition with improved immunogenicity would not have been obvious for the person skilled in the art, because the nature of the interaction of these different antigens at the nasal level could not be predicted from the teaching of the prior art.

3. For the assessment of the present claims 9 and 10 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VII

Certain defects in the international application

Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in the documents D2, D4 and D5 is not mentioned in the

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/CU99/00006

description, nor are these documents identified therein.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

The wording of claim 1 is unclear (Article 6 PCT). It seems that before "preservatives and stabilizers can be added" it should read "wherein"; moreover, the concentration of antigens is not expressed in concentration units, but in absolute mass units.

New Claim 1.

1. A vaccine formulation for nasal administration wherein the components are (a) surface antigen from virus and (b) one or more non-living vaccine antigens synergizing in adjuvant effect with (a), the antigen concentrations are in the range up to 1 mg each, preservatives and stabilizers can be added.

AMENDED SHEET

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN ver la notificación de transmisión del informe de búsqueda internacional (Formulario PCT/ISA/220) y, en su caso, el punto 5 de esta hoja.	
Solicitud internacional n° PCT/CU 99/00006	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 1 Diciembre 1999 (01.12.1999)	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 2 Diciembre 1998 (02.12.1998)
Solicitante CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGÍA		

El presente informe de búsqueda internacional, elaborado por esta Administración encargada de la Búsqueda Internacional, se transmite al solicitante, conforme al artículo 18. Se remite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional comprende un total de 5 hojas.

☒ Se adjunta una copia de cada uno de los documentos citados en el informe relativos al estado de la técnica.

1. Consideraciones sobre el informe

a. En lo que se refiere al **idioma**, la búsqueda internacional se ha realizado sobre la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada en este apartado.

☐ la búsqueda internacional se ha realizado sobre una traducción de la solicitud internacional facilitada a esta Administración (Regla 23.1 b)).

b. En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional (en su caso), la búsqueda internacional se ha basado en la lista de secuencias:

☐ contenida en la solicitud internacional en formato escrito.

☐ presentada conjuntamente con la solicitud internacional en soporte legible por ordenador.

☐ facilitada posteriormente a esta Administración por escrito.

☐ facilitada posteriormente a esta Administración en soporte legible por ordenador.

☐ se ha entregado la declaración, según la cual la lista de secuencias presentada por escrito posteriormente no va más allá de la divulgación hecha en la solicitud internacional tal y como fue presentada.

☐ se ha entregado la declaración, según la cual la información grabada en el soporte legible por ordenador es idéntica a la lista de secuencias presentada por escrito.

2. ☐ Se estima que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (ver recuadro I).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver recuadro II).

4. Con respecto al **título**,

☒ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☐ el texto ha sido establecido por esta Administración con la siguiente redacción:

Formulaciones capaces de potenciar la respuesta inmune a antígenos de hepatitis B administrados por vía mucosal.

5. Con respecto al **resumen**,

☐ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☒ el texto (reproducido en el recuadro III) ha sido establecido por esta Administración de conformidad con la regla 38.2b). El solicitante puede presentar observaciones a esta Administración en el plazo de un mes a contar desde la fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional.

6. La figura de los **dibujos** a publicar junto con el resumen es la siguiente: Figura n° _____

☐ propuesta por el solicitante.

☐ por no haber propuesto el solicitante ninguna figura.

☐ por caracterizar mejor, esta figura, la invención.

☒ No debe publicarse ninguna figura.

Recuadro III TEXTO DEL RESUMEN (Continuación del punto 5 de la primera hoja)

Formulaciones capaces de potenciar la respuesta inmune a antígenos de hepatitis B administrados por vía mucosal. Las formulaciones constan de: a) un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg) y b) un antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis B (HBcAg), generando potentes respuestas mucosales y sistémicas mediante una interacción sinérgica entre los antígenos de la formulación.

Estas formulaciones se aplican para generar vacunas tanto para uso humano como veterinario.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ CU 99/00006

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 39/29, 39/295

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPOQUE, WPI, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 9412617 A1 (INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY LABORATORIES. INC.) 09.06.1994, pág. 20, línea 10 - pág. 23, línea 15; pág. 49, líneas 6-34	1-3, 5-10
X	EP 0271302 A2 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 15.06.1988, pág. 3, líneas 10-30; pág. 7, línea 47 - pág. 8, línea 50	1-3, 6, 9,10
X	EP 0835663 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.) 15.04.1988, pág. 3, línea 12 - pág. 4, línea 50	1,9,10
X	US 5840303 A (CHISARI et al.) 24.11.1998, columna 2, línea 50 - columna 3, línea 67	1
X	EP 0534615 A2 (CYTEL CORPORATION) 31.03.1993, página 3, línea 5 - pág. 5, línea 32	1

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 23 Febrero 2000 (23.02.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
25.04.2000

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2, NL-2280 HV Rijswijk
Tel(+31-70)340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax(+31-70)340-3016

Funcionario autorizado

Ana Collados Martín-Posadillo

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

licitud internacional n°
PCT/ CU 99/00006

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9412617-A	09.06.1994	AU 5679394 A	22.06.1994
EP 0271302 A	15.06.1988	PT 86318 A	01.01.1988
		DK 643387 A	10.06.1988
		US 5143726 A	01.09.1992
		US 4882145 A	12.11.1989
		US 4818527 A	04.04.1989
		CA 1329766 A	24.05.1994
		AU 8223187 A	09.06.1988
		AU 618942 B	16.01.1992
		JP 1025800 A	27.01.1989
EP 0835663 A	15.04.1988	US 6013264 A	11.01.2000
		AU 709406 B	26.08.1999
		IL 105770 A	16.08.1998
		DE 69319728T T	04.02.1999
		ES 2118963T T	01.10.1998
		CZ 283910 B	15.07.1998
		SG 48365 A	17.04.1998
		DE 69319728D D	20.08.1998
		AT 168271T T	15.08.1998
		PL 174077 B	03.06.1998
		EP 0835663 A	15.04.1998
		MX 9302982 A	01.12.1993
		AU 1648097 A	29.05.1997
		AP 567 A	25.11.1996
		ZA 9303541 A	21.06.1994
		WO 9324148 A	09.12.1993
		SK 142194 A	09.08.1995
		SI 9300271 A	31.12.1993
		NZ 253065 A	28.10.1996
		HU 71791 A	28.02.1996
		EP 0642355 A	15.03.1995
		CZ 9402892 A	13.09.1995
		CA 2136429 A	09.12.1993
		AU 4315693 A	30.12.1993
		NO 9444475 A	18.01.1995
		FI 945483 A	20.01.1995
		CN 1085450 A	20.04.1994
		JP 7508267T T	14.09.1995

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

licitud internacional n°
PCT/ CU 99/00006

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5840303 A	24.11.1998	US 5932224 A	03.08.1999
		US 5780036 A	14.07.1998
		AU 679901 B	17.07.1997
		ZA 9206440 A	07.06.1993
		WO 9303753 A	04.03.1993
		OA 9889 A	15.09.1994
		NZ 270625 A	20.12.1996
		NZ 244102 A	20.12.1996
		HU 67529 A	28.04.1995
		EP 0534618 A	31.03.1993
		CZ 9400428 A	15.02.1995
		CA 2115927 A	04.03.1993
		BG 98522 A	31.05.1995
		AU 2540892 A	16.03.1993
		NO 940661 A	19.04.1994
		FI 940919 A	25.04.1994
		JP 6510050T T	10.11.1994
EP 0534615 A	31.03.1993	AU 687725 B	05.03.1998
		NZ 270605 A	27.07.1997
		NZ 244103 A	27.07.1997
		ZA 9206441 A	07.06.1993
		WO 9303764 A	04.03.1993
		OA 9888 A	15.09.1994
		HU 68510 A	28.06.1995
		CZ 9400427 A	16.11.1994
		CA 2115839 A	04.03.1993
		BG 98523 A	31.05.1995
		AU 2548792 A	16.03.1993
		NO 940660 A	22.04.1994
		FI 940918 A	08.04.1994
		JP 6510051T T	10.11.1994

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Mali	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centrafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

FORMULACIONES CONTENIENDO PARTÍCULAS SEMEJANTES A VIRUS COMO INMUNOPOTENCIADORES POR VIA MUCOSAL.

Sector técnico

5 La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con el uso de nuevas formulaciones de adyuvantes con antígenos vacunales. En este caso, el adyuvante es una partícula semejante a virus (VLP), que al mismo tiempo constituye un antígeno de interés en la formulación. El mecanismo de adyuvación se basa en un
10 efecto positivo de un antígeno sobre otro o en una interacción sinérgica entre los antígenos de la formulación.

Técnica anterior

El objetivo técnico que se persigue con la invención propuesta es, precisamente, el desarrollo de formulaciones capaces de potenciar la
15 respuesta inmune a antígenos administrados por vía mucosal, minimizando el número de componentes de la formulación al punto de que la actividad potenciadora se basa en las interacciones entre las mismas partículas a nivel mucosal, por una ruta capaz de generar una inmunidad mucosal y sistémica. Además, el desarrollo de vacunas
20 combinadas para la vía mucosal que tienen como antígeno central al HBsAg, capaz de incrementar la respuesta a antígenos coadministrados.

La ventaja obvia es la eliminación de cualquier otro elemento ajeno a los antígenos de interés y la utilización de una vía que permite un incremento de la respuesta inmune con el incremento en el número de
25 antígenos inoculados. Consideramos que esta es una base o núcleo para el desarrollo de vacunas combinadas para uso mucosal.

El HBcAg es extremadamente inmunogénico durante la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) o luego de inmunización con el mismo. En muchos enfermos crónicos con el VHB, éste es el único antígeno capaz
30 de generar una respuesta inmune. Aun en cantidades de nanogramos puede producir anticuerpos en ratones. Recientemente, varios estudios estructurales han revelado un número de características que ayudan a

explicar su potente inmunogenicidad. Este antígeno se une específicamente a receptores inmunoglobulínicos de membrana para un alto número de células B murinas en reposo y en cantidad suficiente para inducir las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. De esta forma las células B no sensibilizadas, específicas para HBcAg pueden tomar, procesar y presentar al HBcAg a células T auxiliaadoras vírgenes *in vivo* y a hibridomas de células T *in vitro* aproximadamente 10^5 veces más eficientemente que los macrófagos y células dendríticas. Esta relación estructura función explica la gran inmunogenicidad del HBcAg (Milich, D.R. *et al.* 1997 Proc. Natl. Acad. Sci USA Dec23; 94(26): 14648-53).

Estudios bioquímicos y serológicos indican que la resolución de la infección aguda por el virus de la hepatitis B ocurre en el contexto de una eficiente respuesta inmune mediada por células, mientras que la infección crónica se caracteriza por una pobre e indetectable respuesta inmune mediada por células y una inmunidad humoral "relativamente eficiente".

La inmunidad humoral y la mediada por células son reguladas por diferentes grupos de células T auxiliaadoras. Un examen en un modelo murino acerca de los factores que influyen la inducción de células T auxiliaadoras de tipo 1 (Th1) o de tipo 2 (Th2) para los antígenos de la nucleocápsida del VHB (HBcAg/HBeAg) reveló que dicho balance estaba influido por (1) la estructura del antígeno (HBcAg es particulado y el HBeAg es soluble); (2) el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del hospedero y los sitios de células T que eran reconocidos; (3) la regulación cruzada entre las células Th1 y Th2; (4) la tolerancia de células T, que es más completa para Th1 que para Th2; (5) el HBeAg secretado que delecta preferencialmente las células Th1 y (6) el tratamiento con citoquinas, que *in vivo* sesgó la predominancia de la respuesta hacia una respuesta Th1 o Th2. Este balance Th1/Th2 de la respuesta es relevante para el curso agudo o crónico de la infección. Las células Th2 evaden preferencialmente la inducción de tolerancia en comparación con su contraparte Th1. Dado que el HBeAg puede actuar

como un tolerógeno durante la transmisión vertical del virus de la hepatitis B, eliminando las células Th1, la predominancia de células Th2 específicas para HBeAg puede influir en la iniciación y mantenimiento del estado de portador crónico. En este caso la terapia con citoquinas con el objetivo de variar la respuesta Th2 a Th1, pudiera ser beneficiosa en el tratamiento de la infección crónica con hepatitis B (Milich, D.R. 1997 J. Viral. Hepat.; 4 Suppl 2: 48-59).

El efecto de la circulación del HBeAg sobre las células Th1 específicas para HBcAg se examinó transfiriendo células T específicas para HBe/HBcAg en ratones transgénicos dobles para HBeAg y HBcAg. La presencia de HBeAg sérico eliminó la respuesta anti HBcAg mediada por células Th1 y la cambió en dirección al fenotipo Th2. Este resultado sugiere que, en un contexto de infección por hepatitis B, el HBeAg circulante tiene el potencial de eliminar preferencialmente las células Th1 específicas de la respuesta inflamatoria anti-HBeAg y anti-HBcAg, necesaria para el aclaramiento viral, promoviendo la persistencia del virus de la hepatitis B (Milich-DR *et al.* 1998 J-Immunol. Feb 15; 160(4): 2013-21).

Se conoce que los anticuerpos anti-HBcAg están presentes desde el inicio de la enfermedad y alcanzan altas concentraciones en el suero de pacientes crónicamente infectados con el VHB, pero estos anticuerpos no protegen. Los anticuerpos anti-HBc transmitidos pasivamente a recién nacidos de madres que son portadoras crónicas del VHB, no protegen a estos niños de la infección por dicho virus. (Beasley *et al.* 1977 American Journal of Epidemiology 105: 914-918). Sin embargo, se ha demostrado que la inmunización de chimpancés con antígeno de la nucleocápsida protegió parcial o completamente de la infección por el VHB (Iwarson, S. *et al.* 1985 Gastroenterology 88: 763-767; Murray, K. *et al.* 1987 Journal of Medical Virology 23: 101-107). En el estudio de Iwarson, tres chimpancés fueron completamente protegidos. Luego del reto con el VHB, se incrementaron los niveles de anticuerpos anti HBc y anti HBe pero solo un animal seroconvirtió para anti-HBs. En el estudio

de Murray, 2 de 4 chimpancés inmunizados mostraron un bajo nivel de replicación viral luego del reto, el HBsAg fue detectable en el suero por 2 o 3 semanas y luego estos chimpancés desarrollaron una respuesta anti-HBs. Se hipotetizó que la protección incompleta pudo estar dada por la
5 baja respuesta inmune en los animales vacunados sin adyuvante.

Luego de la inmunización con el antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis de marmotas (WHcAg) en Adyuvante Completo de Freund (ACF), se pudo comprobar que la inmunogenicidad para la proteína de la nucleocápsida fue capaz de proteger contra reto con el virus (WHV) sin
10 que hubiese detección de anticuerpos contra la proteína de superficie (WHs) ni síntomas de infección. Aunque no se descarta la posibilidad de que la protección estuviera mediada por anticuerpos anti-proteína de superficie no detectables ayudados por la respuesta Th anti-nucleocápside, se consideró la actividad citotóxicas como responsable de
15 la protección encontrada (Roos, S. *et al.* 1989 J. Gen. Virol. 70, 2087-2095). En un segundo estudio con marmotas se esclareció el papel del HBcAg y el WHcAg en la protección así como el posible mecanismo. Las marmotas fueron inmunizadas con WHcAg y HBcAg y retadas posteriormente con una dosis alta del virus de marmotas. En este
20 experimento se encontró que el WHcAg es un antígeno protector y que existe una protección cruzada ya que 4 de 6 marmotas inmunizadas con HBcAg estaban protegidas de la infección por el virus de la hepatitis de marmotas. Ambos antígenos generaron altos títulos de anticuerpos con una reactividad cruzada menor del 1%, lo que confirma los reportes de
25 protección con antígenos internos del virus de la hepatitis B. Como los epítopes B dominantes de ambos antígenos no parecen ser conservados, este resultado también demuestra que los anticuerpos no son importantes para la protección. Las marmotas inmunizadas con WHcAg/HBcAg reaccionaron con una rápida respuesta de anticuerpos
30 séricos contra proteínas de la superficie viral luego del reto con el virus de la hepatitis de marmotas, indicativo de una ayuda de células T como

potencial mecanismo de protección luego de una inmunización con un antígeno viral interno. (Schodel-F *et al.* Vaccine. 1993; 11(6): 624-8)

La transfección con ADN dimérico del VHB de líneas celulares establecidas de hígado de ratón BALB/C (líneas ML) resultó en la expresión en estas líneas de antígenos del virus de la hepatitis B. La transferencia adoptiva de las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con células ML-1.1 expresando tanto el HBsAg como el HBcAg, causó la regresión de las células tumorales que expresan los antígenos correspondientes en ratones desnudos. En adición, la transferencia de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el HBsAg o el HBcAg también causó regresión tumoral. Estos resultados demuestran que el antígeno de superficie y el antígeno de la nucleocápsida pueden inducir una inmunidad que conduce a la reyección del carcinoma hepatocelular in vivo. (Chen, S.H. *et al.* 1993 Cancer-Res. Oct 1; 53(19): 4648-51)

En la actualidad se encuentran en estudios clínicos fase II/III vacunas terapéuticas consistentes en polipéptidos con epítopes de la nucleocápsida de la hepatitis B específicos para el HLA humano. (Liaw, Y.F. 1997 J.Gastroenterol. Hepatol. Oct; 12(9-10) S227-35).

El efecto "carrier", definido como la provisión de sitios de reconocimiento de células T, físicamente unidos a epítopes para células B para proveer una ayuda T a la síntesis de anticuerpos, tiene en el HBcAg un buen ejemplo de proteína portadora. El HBcAg representa un antígeno altamente inmunogénico en humanos así como en modelos animales. Su capacidad para activar directamente células B y generar fuertes respuestas de células T, además de su eficiente procesamiento y presentación por células presentadoras de antígenos sugieren que el HBcAg puede ser una molécula portadora ideal. Por tanto un número grande de epítopes homólogos y heterólogos han sido conjugados químicamente o fusionados genéticamente al HBcAg por métodos recombinantes para incrementar su inmunogenicidad. Estas estrategias han tenido éxito. Se han diseñado vectores de expresión en bacterias que

permiten la inserción de epitopes B heterólogos en varias posiciones dentro de las partículas de HBcAg y la purificación eficiente de las partículas híbridas.

Los estudios de posición de epitopes B demostraron que una inserción interna cerca del aminoácido 80 continúa siendo inmunodominante permitiendo un incremento en la producción de anticuerpos con respecto a las otras proteínas de fusión. Se han realizado estudios de inmunogenicidad con reto experimental en varios sistemas. Por ejemplo, una secuencia del Circunsporozoito *Plasmodium berghei* fue insertada en dicho sitio y la partícula híbrida purificada HBcAg/CS fue altamente inmunogénica y protegió al 100% de los ratones retados experimentalmente contra la malaria. Con el propósito de desarrollar vacunas orales han sido utilizadas especies vivas avirulentas de *Salmonella* para introducir genes que codifican para las partículas híbridas de HBcAg (Milich, D.R. *et al.* 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. May 31; 754: 187-201).

En resumen, aparte de la relación del HBcAg con la protección, evidenciada total o parcialmente en chimpancés o indirectamente referida por los experimentos con WHcAg, esta proteína posee un número de características que la hacen única. Puede comportarse como un antígeno T dependiente y T independiente (Milich, D.R. *et al.* 1986 Science 234, 1398-1401), es muy inmunogénica, incluso sin la ayuda de adyuvantes y su inoculación sensibiliza preferencialmente células Th1 (Milich, D.R. *et al.* 1997, J. Virol. 71, 2192-2201). Ha demostrado ser muy eficiente como proteína portadora de epitopes heterólogos (Schödel, F. *et al.* 1992 J. Virol. 66: 106-114; Milich-DR *et al.* 1995 Ann-N-Y-Acad-Sci. May 31; 754: 187-20) y las células T auxiliaadoras (Th) específicas para ella median la respuesta de anticuerpos tanto anti-HBcAg como anti-HBsAg (Milich, D.R. *et al.* 1987 Nature (London) 329: 547-549). Estas características inmunológicas son únicas para el HBcAg particulado y no pertenecen a la forma no particulada de esta proteína,

el HBeAg (Milich, D.R. *et al.* 1997 Proc. Natl. Acad. Sci USA Dec 23; 94(26): 14648-53).

Descripción detallada de la invención

En el trabajo objeto de la presente invención se reporta por primera vez
5 una formulación para uso vacunal cuyos componentes fundamentales son el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y el antígeno de la nucleocápsida del mismo virus en proporciones adecuadas. Otros componentes son los estabilizadores y preservos.

La formulación HBsAg/HBcAg es novedosa por la potenciación de la
10 respuesta anti antígeno de superficie que se genera al mezclar el antígeno de la nucleocápsida. Ambos antígenos son componentes del virus de la hepatitis B. Por tanto, el papel del adyuvante lo toma otro antígeno del virus, atractivo *per se* como antígeno vacunal, por lo que se amplía el espectro de la respuesta anti-hepatitis B generada por la
15 formulación vacunal. Otras formulaciones de combinaciones con antígenos de nucleocápsidas, como es el caso de HBsAg/VLP del virus del papiloma humano y por extensión de otros antígenos de cápsidas virales con otras VLP, resultan en un incremento de los títulos para ambos antígenos. Producto de la mezcla del HBsAg con otros antígenos
20 de nucleocápside, juntos o por separado (ejemplo 4), se pudo evidenciar un incremento en la inmunogenicidad sobre otros antígenos coinoculados, lo que evidencia un efecto sinérgico producto de la combinación con el HBsAg. En general, estos resultados permiten la generación de vacunas combinadas a nivel mucosal teniendo como
25 núcleo al HBsAg y permiten además el aprovechamiento de las interacciones positivas inter VLP, considerando las VLP como estructuras proteicas o lipoproteicas organizadas, semejantes a virus, del orden de los nanómetros.

En el caso de la coinoculación del antígeno de superficie y el antígeno de
30 la nucleocápsida del virus de la hepatitis B, se podría generar entonces un producto con mejores características que la vacuna actual contra el virus de la hepatitis B dado que:

-Es posible ampliar el espectro de la respuesta inmune generada porque el HBcAg es considerado como antígeno importante *per se* para la protección anti-VHB. Además, la respuesta inmune anti-HBsAg que se alcanza con la inoculación mucosal a nivel de IgG sérica es tan intensa
5 como la obtenida por la inoculación sistémica en alúmina.

-Entre las ventajas del nuevo producto están las facilidades que ofrece la ruta de inmunización -inmunidad sistémica e inmunidad de mucosas al mismo tiempo, la eliminación de los requerimientos de esterilidad y pirógenos así como la posibilidad de eliminar los costos relacionados con
10 la inyección y toda la logística relacionada con la misma.

-En general se aprecia la disminución en el número y exigencias en los controles de calidad, lo cual reduce los costos.

-Se eliminan los efectos tóxicos generados por la alúmina y los daños relacionados con la inyección.

15 -Es posible utilizar la formulación inicial del HBsAg y el HBcAg como núcleo de vacunas combinadas o múltiples.

-Es posible con esta preparación, favorecida aun más por la ruta de inoculación y por la introducción de otro antígeno que *per se* confiere determinado grado de protección, vacunar a los no respondedores para
20 el antígeno de superficie.

-Las características de esta formulación la hacen apropiada para su introducción en la terapéutica.

En el segundo caso, los antígenos de nucleocápsida favorecedores de un incremento de la inmunogenicidad de otros antígenos coinoculados.

25 Encontramos una gran simplicidad en las formulaciones resultantes y a la vez el incremento en la valencia de estas vacunas con un número mínimo total de antígenos y la posibilidad de eliminar el uso de adyuvantes que introducen antígenos no interesantes para la protección. De esta forma se pueden obtener formulaciones tan
30 reducidas como combinaciones de la nucleocápsida de un virus con su antígeno de superficie, como es el primer caso, hasta formulaciones de nucleocápsidas de un virus con antígenos no capsidares de otro. Se

pueden obtener además, combinaciones de antígenos de una mayor complejidad, pero siempre utilizando este efecto novedoso que se describe en los ejemplos donde se demuestra que es posible potenciar antígenos del mismo patógeno, u otro no necesariamente viral -y de cualquier naturaleza-, usando nucleocápsides virales mezcladas, no asociadas covalentemente.

En un tercer caso, es posible la generación de vacunas combinadas que tengan como núcleo al HBsAg cuyo efecto inmunopotenciador sobre otros antígenos coinoculados queda demostrado en el ejemplo 4. Las ventajas de estas formulaciones están dadas por la asociación efectiva del HBsAg, antígeno central de la vacuna anti VHB, con otros antígenos, con los que se demostró un efecto sinérgico en la respuesta generada para ambos antígenos. Este hecho, además de poseer lo atractivo de las variantes descritas anteriormente, posibilita que sea el HBsAg, antígeno protector contra una enfermedad de amplia distribución mundial, el antígeno central de las formulaciones.

En general, con respecto a otras vacunas mucosales, es posible señalar las siguientes ventajas:

-El proceso de adyuvación es por mezcla simple, no requiere garantizar adsorción del antígeno y la cantidad de HBcAg u otro antígeno de nucleocápsida, está al nivel del HBsAg.

-Es permisible la filtración como método de esterilización lo cual no es posible para muchos adyuvantes mucosales, fundamentalmente los particulados por encima de los 0.2µm.

-La sencillez del proceso de producción y los altos niveles de expresión con que se produce el HBcAg en *E. coli* permiten la obtención de grandes cantidades con bajos costos en comparación con otros adyuvantes mucosales.

Las formulaciones objeto de esta invención pueden presentar, en dependencia de la ruta de inoculación y las especies a inmunizar, volúmenes de 0.01 hasta 10mL. La dosis de los antígenos no capsidares puede variar entre 0.001 a 1mg, rango en que también se encuentra la

dosis del antígeno de la nucleocápsida o sus derivados en la formulación vacunal final.

EJEMPLOS DE REALIZACION

Ejemplo 1

5 Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad del HBcAg, por vía intranasal, se inocularon 3 grupos de 8 ratones BALB/c hembras con una dosis de 10µg de antígeno en todos los casos. El primer grupo se inoculó con el antígeno en acemanano (CIGB, La Habana) 3mg/mL (peso liofilizado), adyuvante usado para la inmunopotenciación de
10 sistemas particulados por vía nasal. El grupo 2 se inoculó con el HBcAg en solución tampón fosfato-salina (PBS). Al grupo 3 se le inyectó el antígeno en alúmina por vía subcutánea y se utilizó como grupo control de inoculación sistémica. El esquema seguido fue de inoculaciones los días 0, 14 y 28 y la extracción se realizó el día 42. La
15 respuesta de anticuerpos se cuantificó por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) para la determinación de IgG anti-HBcAg en suero.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

Se demostró que con el uso de acemanano no fue posible incrementar
20 la respuesta inmune al HBcAg, ya que el antígeno en PBS generó una respuesta similar a la obtenida usando el acemanano como inmunopotenciador (Fig. 1). Las respuestas luego de inoculación nasal tanto en acemanano como en PBS no difirieron significativamente de la obtenida por el antígeno en alúmina por vía subcutánea. Este
25 resultado avala el uso intranasal del HBcAg.

Ejemplo 2

Con el objetivo de demostrar la actividad inmunopotenciadora del HBcAg sobre el HBsAg por vía intranasal, se ensayaron 4 grupos de 8
30 ratones BALB/c hembras. El esquema tuvo 2 inoculaciones los días 0 y 14. La extracción se realizó el día 21. El grupo 1 se inoculó con 10µg de HBsAg en PBS, el grupo 2 con 10µg de HBsAg en acemanano (CIGB, La Habana) 3mg/mL (peso liofilizado), el grupo 3 con 10µg de

HBsAg y 10µg de HBcAg. Como control sistémico se utilizó el grupo 4, donde se inocularon 10µg de HBsAg en alúmina por vía subcutánea (Fig. 2).

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

De este experimento se evidenció que es posible potenciar la respuesta anti-HBsAg con la coinoculación por vía mucosal, en este caso intranasal, del HBsAg y el HBcAg. La respuesta fue significativamente superior con respecto al grupo donde se inoculó al HBsAg en PBS y similar a la alcanzada por el grupo en que se inoculó al HBsAg en acemanano. La inoculación sistémica del HBsAg en alúmina tampoco difirió significativamente de los grupos inoculados con acemanano por vía nasal y con HBcAg por la misma vía.

Ejemplo 3

Con el objetivo de estudiar el efecto potenciador del HBcAg a diferentes dosis en el modelo murino, se seleccionaron 6 grupos de 6 ratones BALB/c hembras. El esquema que se siguió fue: inoculación los días 0, 14 y 28 y extracción los días 26 y 42. Los grupos ensayados se correspondieron con: (1) 5 µg de HBsAg en PBS vía nasal; (2, 3 y 4) 5 µg de HBsAg con 5, 10 y 20µg de HBcAg respectivamente vía nasal, (5) 5µg de HBsAg en acemanano 3mg/mL vía nasal y (6) 5µg de HBsAg en alúmina 0.5mg/mL por vía intramuscular.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

En este experimento se corroboró que es posible potenciar la respuesta anti-HBsAg con la coinoculación por vía intranasal del HBsAg y el HBcAg. La respuesta de IgG en suero para los tres grupos inmunizados con ambos antígenos fue significativamente superior a la que se obtuvo por inoculación del HBsAg en PBS y similar a la alcanzada por el grupo en que se inoculó al HBsAg en acemanano. Los valores de título obtenidos por la inoculación sistémica del HBsAg en alúmina tampoco difirieron significativamente de los grupos

inoculados con acemanano por vía nasal y con alúmina por vía intramuscular. En el caso del grupo 4, la respuesta anti HBsAg disminuyó significativamente con respecto a la obtenida en el grupo 3, la diferencia entre ambos grupos reside en un incremento al doble en el grupo 4 con respecto a la cantidad de HBcAg inoculada. Este incremento puede reducir las posibilidades de penetración del HBsAg en la mucosa, disminuyendo de esta forma la respuesta al HBsAg.

Ejemplo 4

Con el objetivo de estudiar la interacción de diferentes antígenos particulados, se emplearon las partículas semejantes a virus del Virus del Papiloma Humano 16 (VLP del VPH 16), el HBsAg y el HBcAg. Se ensayaron 8 grupos de 6 ratones BALB/c hembras cada uno. El esquema que se siguió fue: inoculación los días 0 y 14 con una extracción a los 7 días de la segunda inoculación.

Como se puede apreciar al comparar en el primer gráfico la respuesta obtenida anti-HBsAg, cuando se inocula dicho antígeno mezclado con acemanano (grupo 6), es similar a la obtenida cuando se inocula con el HBcAg, (grupos 7) respectivamente. Lo cual constituye una tercera comprobación del efecto inmunopotenciador del antígeno de la nucleocápsida del VHB.

De este experimento se puede concluir además que ni el acemanano ni el HBcAg incrementan la respuesta de anticuerpos a las VLP de HPV, como se puede apreciar al comparar los grupos 4 y 5 con el 8, en el gráfico de la respuesta anti VLP del VPH. El análisis estadístico, utilizando el test t de Student ($p < 0.05$ se consideró diferencia significativa), mostró que no existen diferencias significativas entre estos tres grupos.

Analizando la respuesta anti HBcAg del grupo 5, donde se inoculan solamente el HBcAg y las VLP de VPH, se puede encontrar que hay una disminución fuerte de la respuesta anti HBcAg con respecto al grupo 7 donde se introduce el HBcAg junto al HBsAg. La presencia de estas dos partículas por si solas antagonizan a nivel de mucosa nasal.

La respuesta anti HBcAg en el grupo 5 es significativamente inferior a la respuesta generada por el mismo antígeno en presencia del HBsAg (grupo 7). Sin embargo, en el grupo 2, con la adición del HBsAg se recupera la respuesta anti HBcAg de tal forma que se vuelve
5 significativamente superior a la obtenida por el grupo 5 y no difiere significativamente de la respuesta anti HBcAg del grupo 7, donde este antígeno se encuentra junto al HBsAg, lo cual nos permite asumir la existencia de una interacción positiva del HBsAg con los antígenos de la cápsida del HPV y del VHB y de una interacción negativa entre los
10 antígenos de la cápsida del VHB y del HPV. El efecto potenciador a nivel de mucosas puede ocurrir en ambas direcciones, lo cual posibilita el diseño de vacunas combinadas que tengan como núcleo al HBsAg o la combinación HBs/HBc.

Analizando la respuesta anti VLP, podemos apreciar que el efecto del
15 HBsAg no sólo restablece la respuesta anti HBcAg como ocurre en el grupo 2 sino que potencia significativamente la respuesta anti VLP, como se puede apreciar cuando comparamos los grupos 1, 2 y 3 con el grupo 8 donde las VLP se encuentran en PBS. Entre los grupos 1, 2 y 3 no hay diferencias significativas y los tres son significativamente
20 superiores al grupo 8.

Entre los grupos 1 y 3 donde el polisacárido se adiciona a la mezcla (grupo 1) o se tiene la mezcla de HBs y VLP solamente (grupo 3), no existieron diferencias significativas en cuanto a respuesta anti-HBsAg.

Tampoco hubo diferencias en la respuesta anti HBsAg entre el grupo 3
25 y los grupos en que el HBsAg se inoculó con el acemanano o con el HBcAg (grupos 6 y 7). Estos resultados evidencian la existencia de un efecto inmunopotenciador de las VLP del VPH sobre el HBsAg.

Estos resultados avalan el uso de formulaciones combinadas por vía mucosal usando al HBsAg como antígeno central. También es
30 atractiva la simple unión del HBsAg a las VLP de HPV y se hace real la posibilidad de potenciación de otros antígenos coadministrados con el HBsAg.

Estos antígenos, introducidos por vía nasal, tienen como ventaja la posibilidad de obtener formulaciones complejas en las que encontramos una respuesta de anticuerpos que no disminuye con la introducción de nuevos antígenos (como por ejemplo las VLP de HPV al HBcAg y el HBsAg, grupo 2), comparado con formulaciones combinadas sencillas como HBsAg/HBcAg o formulaciones simples como HBsAg/Acemanano.

Ejemplo 5

Con el objetivo de demostrar la actividad inmunopotenciadora del antígeno de la nucleocápsida del virus de la Hepatitis C (HCV NC) sobre el HBsAg por vía intranasal, se ensayaron 3 grupos de 8 ratones BALB/c hembras. El esquema tuvo 3 inoculaciones los días 0, 14 y 28. La extracción se realizó el día 42. El grupo 1 se inoculó con 10µg de HCV NC en PBS, el grupo 2 se inoculó con 5µg de HBsAg en PBS y el grupo 3 con 5µg de HBsAg y 10µg de HCV NC en PBS (CIGB, La Habana) (Fig. 5).

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

De este experimento se evidenció que es posible potenciar la respuesta anti-HBsAg con la coinoculación por vía mucosal, en este caso intranasal, del HBsAg y la nucleocápsida del VHC. La respuesta fue significativamente superior con respecto al grupo donde se inoculó al HBsAg en PBS.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de 3 dosis (0, 14 y 28 días). La extracción se realizó el día 42. Los grupos 1 y 2 fueron inoculados con 50µL por vía intranasal. El grupo 3 se inoculó por vía subcutánea con 100µL.

Figura 2. Esquema de 2 dosis (0, 14 días). La extracción se realizó el día 21. Los grupos 1, 2 y 3 fueron inoculados con 50 μ L por vía intranasal. El grupo 4 se inoculó por vía subcutánea con 100 μ L.

Figura 3. Esquema de 3 dosis (0, 14, 28 días). La extracción se realizó el día 26. Los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron inoculados por vía intranasal con un volumen de 50 μ L. El grupo 6 se inoculó por vía intramuscular con 100 μ L.

Figura 4. Esquema de 2 dosis (0, 14 días). La extracción se realizó el día 26. Todos los grupos fueron inoculados por vía intranasal con un volumen de 50 μ L. La composición de los grupos ensayados se muestra en la tabla que encabeza la figura.

Figura 5. Esquema de 3 dosis (0, 14 y 28 días). La extracción se realizó el día 42. Los grupos 1, 2 y 3 fueron inoculados con 50 μ L por vía intranasal.

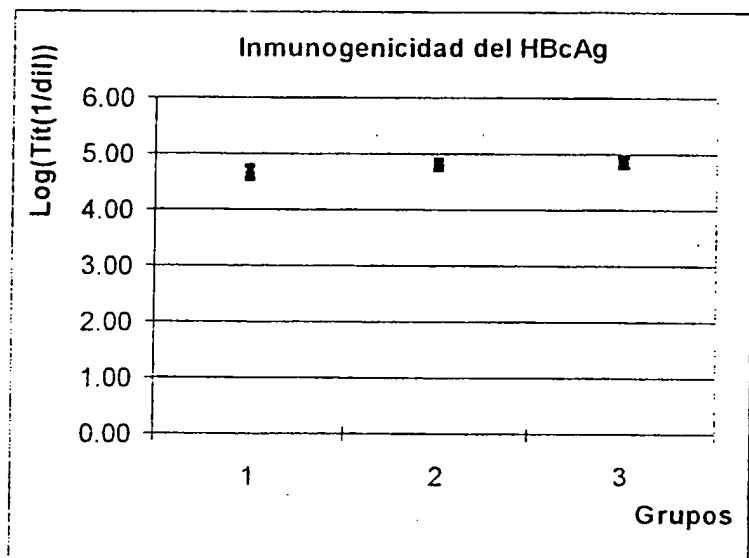
REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica para uso nasal caracterizada porque sus componentes principales son (a) un antígeno de superficie viral y (b) uno o más antígenos vacunales, que
5 sinergizan en efecto adyuvante con (a), en una dosis que varía en un rango de hasta 1mg de cada antígeno por inoculación, pudiendo adicionarse otros componentes como preservantes y estabilizadores de dicha formulación.
- 10 2. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque su componente (a) es el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B y su componente (b) es un antígeno de nucleocápsida viral.
- 15 3. Una formulación farmacéutica según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque su componente (b) es el antígeno de la nucleocápsida del Virus de la Hepatitis B.
- 20 4. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque el componente (b) es una partícula semejante a virus que contiene antígenos de la cápsida del Virus del Papiloma Humano.
- 25 5. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque el componente (b) es una partícula semejante a virus que contiene antígenos de la cápsida del Virus de la Hepatitis C.
- 30 6. Una formulación de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada porque el componente (a) es el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y el componente (b) es un antígeno vacunal de cualquier naturaleza o una mezcla de estos antígenos vacunales que reciben un efecto inmunopotenciador del propio antígeno de superficie de la hepatitis B.
7. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1-6, inoculada en estado líquido, sólido o aerosol.

8. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1-6 para inoculación mucosal.
9. Una formulación de acuerdo a la reivindicaciones 1-6 para uso como vacuna terapéutica.
- 5 **10.** Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1-6 para uso como vacuna preventiva.

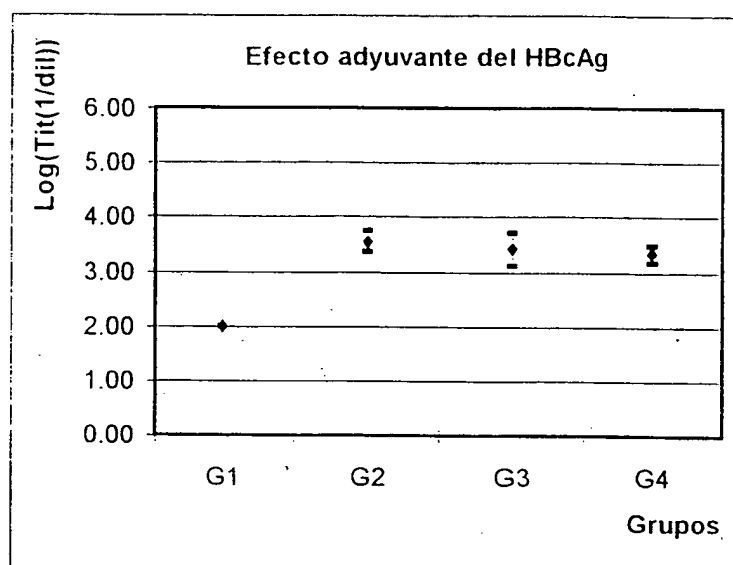
Primer Esquema

1-10 μ g HBcAg / acemanano 3mg/mL	IN
2-10 μ g HBcAg / PBS 1X	IN
3-10 μ g HBcAg / alúmina 0.5mg/mL	SC

**Fig. 1**

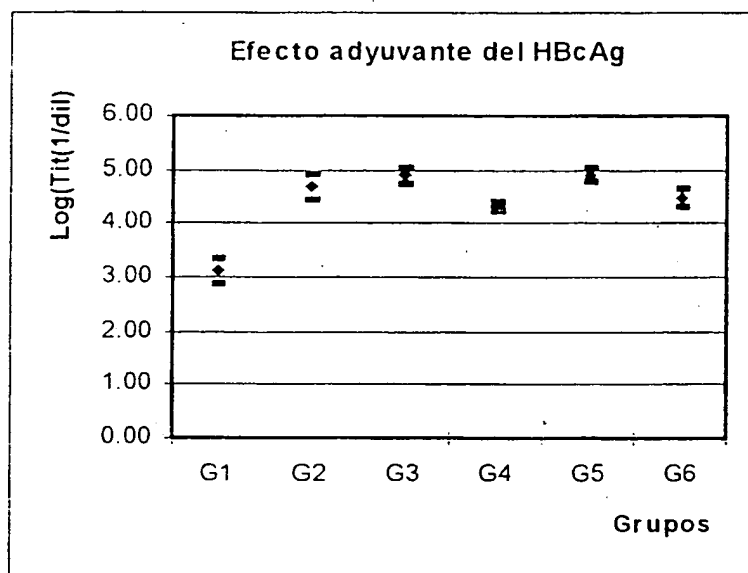
Segundo Esquema

1-10 μ g HBsAg/ PBS 1X	IN
2-10 μ g HBsAg/ acemanano 3mg/mL	IN
3-10 μ g HBsAg/ 10 μ g HBcAg / PBS 1X	IN
4-10 μ g HBsAg/ Alúmina 0.5mg/mL	SC

**Fig. 2**

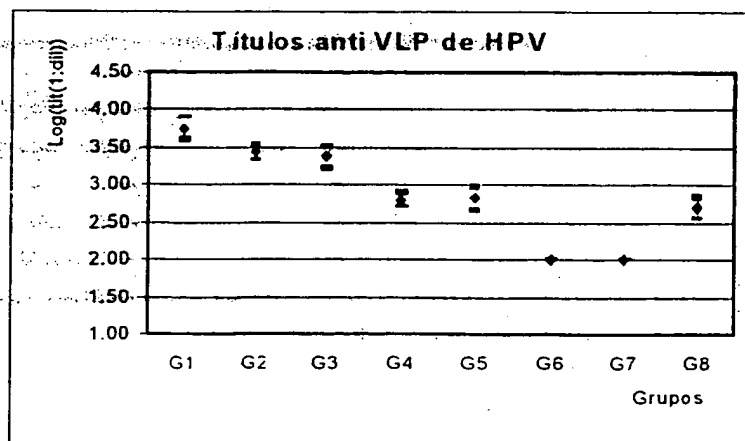
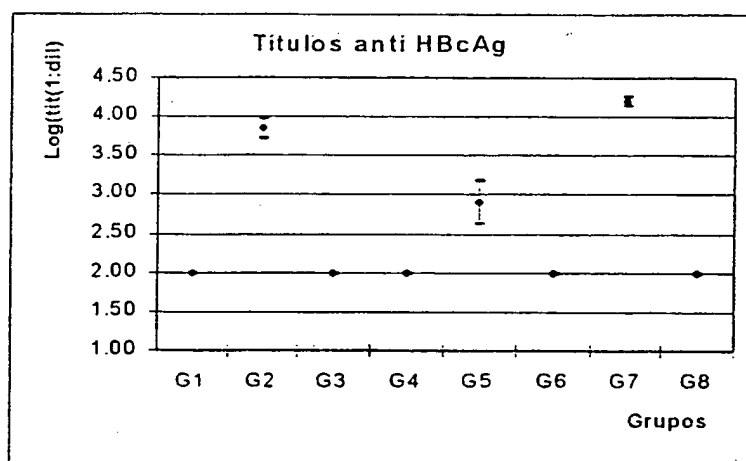
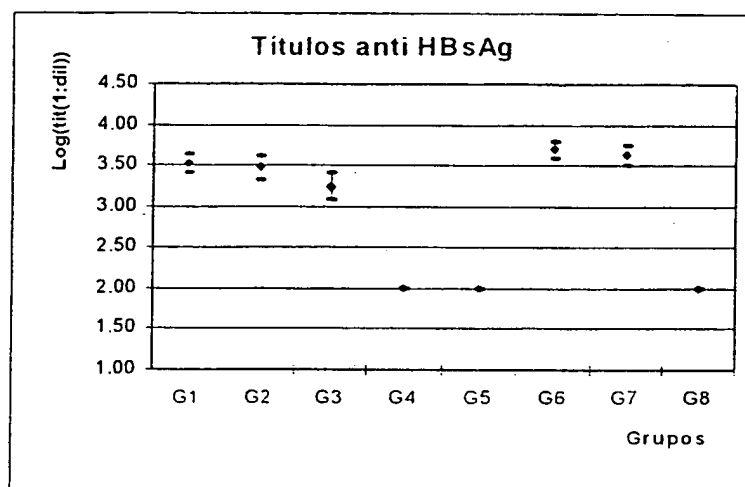
Tercer Esquema

- | | |
|---------------------------------------|----|
| 1- 5 μ g HBsAg / PBS 1X | IN |
| 2- 5 μ g HBsAg / 5 μ g HBcAg | IN |
| 3- 5 μ g HBsAg / 10 μ g HBcAg | IN |
| 4- 5 μ g HBsAg / 20 μ g HBcAg | IN |
| 5- 5 μ g HBsAg / acemanano 3mg/mL | IN |
| 6- 5 μ g HBsAg / alúmina 0.5mg/mL | IM |

**Fig. 3**

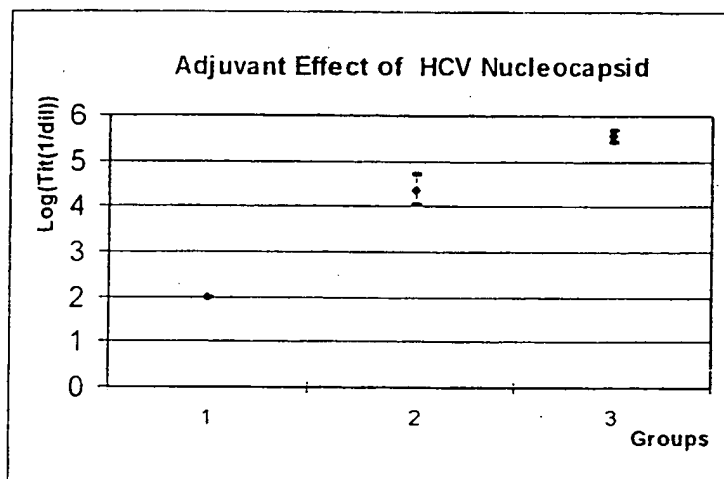
Cuarto Esquema: Sinergismo a nivel mucosal.

Acemanano 3mg/mL	X			X		X		
HBcAg 5µg/dosis		X			X		X	
HBsAg 5µg/dosis	X	X	X			X	X	
VLP /HPV 5µg/dosis	X	X	X	X	X			X

**Fig. 4** La composición, por grupos, en la parte superior de la figura.

Quinto Esquema

1-10 μ g NC de HCV / PBS 1X	IN
2-5 μ g HBsAg/ PBS 1X	IN
3-10 μ g HBsAg/ 10 μ g HCV NC / PBS 1X	IN

**Fig. 5**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 99 / 00006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7: **A61K 39/29, 39/295**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7: **A61K**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CIBEPAT, EPOQUE, WPI, MEDLINE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9412617 A1 (INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY LABORATORIES, INC.) 9 June 1994 (09.06.94), page 20, line 10-page 23, line 15 ; page 49, lines 6-34	1-3, 5-10
X	EP 0271302 A2 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 15 June 1988 (15.06.88), page 3, lines 10-30 ; page 7, line 47-page 8, line 50	1-3, 6, 9, 10
X	EP 0835663 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A) 15 April 1988 (15.04.88), page 3, line 12-page 4, line 50	1, 9, 10
X	US 5840303 A (CHISARI et al) 24 November 1998 (24.11.98), column 2, line 50-column 3, line 67	1
X	EP 0534615 A2 (CYTEL CORPORATION) 31 March 1993 (31.03.93), page 3, Line 5-page 5, line 32	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art, which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 February 2000 (23.02.00)Date of mailing of the international search report
25 April 2000 (24.04.00)

Name and mailing address of the ISA

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CU 99/00006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5840303 A	24.11.1998	US 5932224 A	03.08.1999
		US 5780036 A	14.07.1998
		AU 679901 B	17.07.1997
		ZA 9206440 A	07.06.1993
		WO 9303753 A	04.03.1993
		OA 9889 A	15.09.1994
		NZ 270625 A	20.12.1996
		NZ 244102 A	20.12.1996
		HU 67529 A	28.04.1995
		EP 0534618 A	31.03.1993
		CZ 9400428 A	15.02.1995
		CA 2115927 A	04.03.1993
		BG 98522 A	31.05.1995
		AU 2540892 A	16.03.1993
		NO 940661 A	19.04.1994
		FI 940919 A	25.04.1994
		JP 6510050T T	10.11.1994
<hr/>			
EP 0534615 A	31.03.1993	AU 687725 B	05.03.1998
		NZ 270605 A	27.07.1997
		NZ 244103 A	27.07.1997
		ZA 9206441 A	07.06.1993
		WO 9303764 A	04.03.1993
		OA 9888 A	15.09.1994
		HU 68510 A	28.06.1995
		CZ 9400427 A	16.11.1994
		CA 2115839 A	04.03.1993
		BG 98523 A	31.05.1995
		AU 2548792 A	16.03.1993
		NO 940660 A	22.04.1994
		FI 940918 A	08.04.1994
		JP 6510051T T	10.11.1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CU 99/00006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9412617 A	09.06.1994	AU 5679394 A	22.06.1994
EP 0271302 A	15.06.1988	PT 86318 A	01.01.1988
		DK 643387 A	10.06.1988
		US 5143726 A	01.09.1992
		US 4882145 A	12.11.1989
		US 4818527 A	04.04.1989
		CA 1329766 A	24.05.1994
		AU 8223187 A	09.06.1988
		AU 618942 B	16.01.1992
		JP 1025800 A	27.01.1989
EP 0835663 A	15.04.1988	US 6013264 A	11.01.2000
		AU 709406 B	26.08.1999
		IL 105770 A	16.08.1998
		DE 69319728T T	04.02.1999
		ES 2118963T T	01.10.1998
		CZ 283910 B	15.07.1998
		SG 48365 A	17.04.1998
		DE 69319728D D	20.08.1998
		AT 168271T T	15.08.1998
		PL 174077 B	03.06.1998
		EP 0835663 A	15.04.1998
		MX 9302982 A	01.12.1993
		AU 1648097 A	29.05.1997
		AP 567 A	25.11.1996
		ZA 9303541 A	21.06.1994
		WO 9324148 A	09.12.1993
		SK 142194 A	09.08.1995
		SI 9300271 A	31.12.1993
		NZ 253065 A	28.10.1996
		HU 71791 A	28.02.1996
		EP 0642355 A	15.03.1995
		CZ 9402892 A	13.09.1995
		CA 2136429 A	09.12.1993
		AU 4315693 A	30.12.1993
		NO 9444475 A	18.01.1995
		FI 945483 A	20.01.1995
		CN 1085450 A	20.04.1994
		JP 7508267T T	14.09.1995

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ CU 99/00006

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 39/29, 39/295

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPOQUE, WPI, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 9412617 A1 (INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY LABORATORIES, INC.) 09.06.1994, pág. 20, línea 10 - pág. 23, línea 15; pág. 49, líneas 6-34	1-3, 5-10
X	EP 0271302 A2 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 15.06.1988, pág. 3, líneas 10-30; pág. 7, línea 47 - pág. 8, línea 50	1-3, 6, 9, 10
X	EP 0835663 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.) 15.04.1988, pág. 3, línea 12 - pág. 4, línea 50	1, 9, 10
X	US 5840303 A (CHISARI et al.) 24.11.1998, columna 2, línea 50 - columna 3, línea 67	1
X	EP 0554615 A2 (CYTEL CORPORATION) 31.03.1993, página 3, línea 5 - pág. 5, línea 32	1

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

- * Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
- "X" documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
- "Y" documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 23 Febrero 2000 (23.02.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
25.04.2000

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional:
European Patent Office P.B. 5818 Patentaan 2, NL-2280 HV Rijswijk
Tel: +31-70/340-2040 Tlx 31 651 epo n.
Fax: +31-70/340-3016

Funcionario autorizado

Ana Collados Martin-Posadillo

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Sol. id internacional nº

PCT/ CU 99/00006

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5840303 A	24.11.1998	US 5932224 A	03.08.1999
		US 5780036 A	14.07.1998
		AU 679901 B	17.07.1997
		ZA 9206440 A	07.06.1993
		WO 9303753 A	04.03.1993
		OA 9889 A	15.09.1994
		NZ 270625 A	20.12.1996
		NZ 244102 A	20.12.1996
		HU 67529 A	28.04.1995
		EP 0534618 A	31.03.1993
		CZ 9400428 A	15.02.1995
		CA 2115927 A	04.03.1993
		BG 98522 A	31.05.1995
		AU 2540892 A	16.03.1993
		NO 940661 A	19.04.1994
		FI 940919 A	25.04.1994
		JP 6510050T T	10.11.1994
EP 0534615 A	31.03.1993	AU 687725 B	05.03.1998
		NZ 270605 A	27.07.1997
		NZ 244103 A	27.07.1997
		ZA 9206441 A	07.06.1993
		WO 9303764 A	04.03.1993
		OA 9888 A	15.09.1994
		HU 68510 A	28.06.1995
		CZ 9400427 A	16.11.1994
		CA 2115839 A	04.03.1993
		BG 98523 A	31.05.1995
		AU 2548792 A	16.03.1993
		NO 940660 A	22.04.1994
		FI 940918 A	08.04.1994
		JP 6510051T T	10.11.1994

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 99/00006

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9412617 A	09.06.1994	AU 5679394 A	22.06.1994
EP 0271302 A	15.06.1988	PT 86318 A	01.01.1988
		DK 645387 A	10.06.1988
		US 5143726 A	01.09.1992
		US 4882145 A	12.11.1989
		US 4818527 A	04.04.1989
		CA 1329766 A	24.05.1994
		AU 8223187 A	09.06.1988
		AU 618942 B	16.01.1992
		JP 1025800 A	27.01.1989
EP 0835663 A	15.04.1988	US 6013264 A	11.01.2000
		AU 709406 B	26.08.1999
		IL 105770 A	16.08.1998
		DE 69319728T T	04.02.1999
		ES 2118963T T	01.10.1998
		CZ 283910 B	15.07.1998
		SG 48365 A	17.04.1998
		DE 69319728D D	20.08.1998
		AT 168271T T	15.08.1998
		PL 174077 B	03.06.1998
		EP 0835663 A	15.04.1998
		MX 9302982 A	01.12.1993
		AU 1648097 A	29.05.1997
		AP 567 A	25.11.1996
		ZA 9303541 A	21.06.1994
		WO 9324148 A	09.12.1993
		SK 142194 A	09.08.1995
		SI 9300271 A	31.12.1993
		NZ 253065 A	28.10.1996
		HU 71791 A	28.02.1996
		EP 0642355 A	15.03.1995
		CZ 9402892 A	13.09.1995
		CA 2136429 A	09.12.1993
		AU 4315693 A	30.12.1993
		NO 9444475 A	18.01.1995
		FI 945483 A	20.01.1995
		CN 1085450 A	20.04.1994
		JP 7508267T T	14.09.1995